

© ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России, 2023

УДК 57.084:613.83

## ВЛИЯНИЕ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К МОРФИНУ НА ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ ВАКЦИНИРОВАННЫХ КРЫС В ЭКСПЕРИМЕНТЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРЕПАРАТА НАНОЧАСТИЦ ИЗ ТРИТЕРПЕНОИДОВ БЕРЕСТЫ В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТА

Берзина А.Г.<sup>1</sup>, Ульянова Л.И.<sup>1</sup>, Савина М.А.<sup>1</sup>, Буркова А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный научный центр наркологии – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» г. Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»  
Институт тонких химических технологий  
им. М.В. Ломоносова  
г. Москва, Россия

Статья поступила 17.04.2023

В работе представлены материалы по изучению поведения крыс в тесте «открытое поле» после цикла иммунизации препаратом первичных кроличьих антител (АТ1-М) к двум производным морфина (6-гемисукцинильному и 3-О-карбоксиметильному эфирам). Для усиления иммунного ответа использовали адъювант САНЧ (сферические аморфные наночастицы из тритерпеноидов бересты) в сравнении с адъювантом Фрейнда (АФ). Проведенные исследования по изучению адъювантных свойств наночастиц из экстракта бересты показали, что препарат САНЧ приводит к усилению иммунного ответа аналогично применяемым на животных полному адъюванту Фрейнда (ПАФ) и неполному адъюванту Фрейнда (НАФ). Образующиеся у крыс в результате вакцинации антиидиотипические антитела к морфину (вторичные АТ2-М) проявляли морфиноподобные свойства на клеточной культуре глиобластомы Т98G, экспрессирующей на своей поверхности опиоидные рецепторы. Крысы, вакцинированные препаратом АТ1-М + САНЧ, обладали более высокой ориентировочно-исследовательской деятельностью в тесте «открытое поле» и незначи-

### Об авторах:

**Берзина Ася Григорьевна** (автор для переписки), канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии и иммунохимии ННЦ наркологии – филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России; eLibrary SPIN: 5640-3962; ORCID: 0009-0002-9221-6660; [berzina.a@serbsky.ru](mailto:berzina.a@serbsky.ru)

**Ульянова Людмила Ивановна**, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии и иммунохимии ННЦ наркологии – филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России; eLibrary SPIN: 8686-8276; ORCID: 0009-0007-7729-1167.

**Савина Мария Анатольевна**, младший научный сотрудник лаборатории аналитической токсикологии и иммунохимии ННЦ наркологии – филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России; eLibrary SPIN: 3705-4910; ORCID: 0000-0002-1549-8329.

**Буркова Анна Андреевна**, магистр по направлению «аналитическая химия» ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова; ORCID: 0009-0007-3471-4852.

тельным увеличением двигательной активности по сравнению с контролем – интактными крысами.

**Ключевые слова:** антиидиотипические антитела, производные морфина, тест «открытое поле», двигательная активность, наночастицы, тритерпеноиды бересты, бетулин, адъюванты, иммунный ответ, крысы.

**Для цитирования:** Берзина А.Г., Ульянова Л.И., Савина М.А., Буркова А.А. Влияние антиидиотипических антител к морфину на особенности поведения вакцинированных крыс в эксперименте с применением препарата наночастиц из тритерпеноидов бересты в качестве адъюванта // Вопросы наркологии. 2023. Т. 35, № 3. С. 85–97.

## ВВЕДЕНИЕ

Расстройства, связанные с употреблением психоактивных веществ, особенно опиоидов, являются серьезной проблемой общественного здравоохранения. Несмотря на то, что первичная заболеваемость опиоидной наркоманией в России неуклонно снижалась в период с 2009 по 2020 г., доля отравлений опиатами остается наибольшей среди всех отравлений наркотиками. Так, отравления метадонном, включая смертельные и несмертельные, составили 18,9%, отравления героином – 11,4%, другими опиатами (кодеин, морфин) – 11% [1].

Во многих странах мира для лечения опиатной зависимости широко применяется метод заместительной терапии метадонном. В России данная практика в настоящее время запрещена.

В последние годы многими зарубежными исследователями, а также учеными нашей страны изучается возможность применения иммунотерапии для борьбы с наркоманией. Вакцины против психоактивных веществ (ПАВ) могут помочь предотвратить передозировку и нейротоксичность наркотиков. За рубежом вакцины против морфина, героина, оксикодона, фентанила и метамфетамина в настоящее время проходят доклинические испытания. При их разработке в качестве иммуногена используются гаптены психоактивных веществ, конъюгированные с белками-носителями [2]. Российскими учеными проводились исследования по разработке антиидиотипической вакцины от опиатной зависимости, в которой роль иммуногена выполняли поликлональные антиидиотипические антитела к двум производным морфина, выполняющие в данном случае роль имитатора исходного антигена [3]. Также в литературе имеются данные об использовании моноклональных антиморфиновых антител в качестве иммуногена. Применение такого иммуногена для вакцинации крыс в экспериментах по самовведению морфина приводило к снижению влечения к наркотику [5].

Одним из перспективных направлений исследования биологически активных веществ и лекарственных препаратов является использование *in vitro* модели культур перевиваемых клеточных линий [6; 7]. Именно благодаря клеточным технологиям появляется возможность оценить реальное действие ПАВ и иммунобиологических препаратов на синтез ДНК клеточных культур путем

опосредованного влияния на различные рецепторы. В частности, нами ранее было установлено, что на фоне введения морфина или лоперамида в культуру лимфоцитов человека и перевиваемую клеточную линию глиомы T98G наблюдается увеличение синтеза ДНК, что, по-видимому, может служить одним из доказательств их взаимодействия с  $\mu$ -опиатными рецепторами [8], присутствие которых на клеточных мембранах используемых культур доказано М. Lazarczyk с соавт., а позднее J. Kraus [9; 10]. В частности, этим объясняется полная блокада стимулирующего эффекта морфина на синтез ДНК при внесении в культуры лимфоцитов налоксона одновременно с морфином [9]. Исходя из вышесказанного, использование культуры лимфоцитов человека и перевиваемой клеточной линии глиомы T98G позволяет выявить специфическое действие испытуемых веществ на  $\mu$ -опиатные рецепторы, установить их агонистические или антагонистические свойства, а также определить в каких концентрациях происходят наблюдаемые изменения.

При разработке вакцин, как известно, для повышения их эффективности в экспериментальных и клинических исследованиях применяют адъюванты различного происхождения: минеральные, растительные, микробные. Конъюгированные вакцины против наркозависимости чаще всего в качестве адъюванта содержат гидроксид алюминия. В доклинических испытаниях на грызунах для усиления иммунного ответа используется адъювант Фрейнда.

Ранее в наших исследованиях при разработке вакцины от опиатной зависимости иммунизация кроликов препаратами мышинных моноклональных антител к производным морфина проводилась с использованием солей алюминия. При этом результаты экспериментов были отрицательными. По-видимому, адсорбция антигенов на солях алюминия снижала их иммуногенность. В связи с этим при разработке фармкомпозиций для вакцинации было принято решение использовать в качестве адъюванта сферические аморфные наночастицы (САНЧ) из тритерпеноидов бересты [11]. Было показано, что эти наночастицы не взаимодействуют с эритроцитами, но взаимодействуют с гранулоцитами, лимфоцитами и макрофагами [12]. Адъювантные свойства препарата САНЧ были изучены в работе [13], где отмечалось отсутствие побочных эффектов на состояние животных в процессе иммунизации.

Ранее в наших экспериментах при разработке вакцинных препаратов от опиатной зависимости для усиления иммунного ответа использовался масляный адъювант Фрейнда, разрешенный только для работы с животными.

Цель настоящего исследования – изучить иммунный ответ у крыс на введение первичных антител против морфина (AT1-M) кролика с применением в качестве адъюванта САНЧ в сравнении с действием адъюванта Фрейнда, изучить в системе *in vitro* биологические свойства выделенных AT2-M, а также выявить поведенческие особенности крыс после иммунизации.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе была использована кроличья сыворотка крови с титром  $5 \times 10^{-7}$ , полученная к двум производным морфина, конъюгированным с бычьим сывороточным альбумином – 3-О-карбоксиметильному (КММ-БСА) и 6-гемисукцинильному (ГСМ-БСА). АТ1-М выделяли методом двукратного осаждения ПЭГ-6000. Специфичность АТ1-М определяли с помощью конкурентного метода ИФА. В качестве ингибитора использовали раствор морфина гидрохлорида (в дозах от  $10^{-2}$  до  $10^{-13}$  М с десятикратными разведениями).

В качестве адъюванта при иммунизации крыс препаратом АТ1-М использовали препарат САНЧ [11], полученный из бересты экстракта сухого (БЭС) в ФГБОУ ВО «МИРЭА». Для сравнения применялся адъювант Фрейнда (Sigma-Aldrich), полный (ПАФ) и неполный (НАФ). Работа проводилась на крысах-самцах линии Wistar с соблюдением международных правил по проведению медико-биологических исследований. Экспериментальные животные весом 150–170 г были разделены на группы ( $n = 10$ ), схема иммунизации представлена в табл. 1.

Таблица 1. Схема иммунизации крыс

№ группы животных	Антиген, доза	Препараты для усиления иммунного ответа, доза	Способ введения препаратов
1	АТ1 кролика, 1 мг/кг	Без адъюванта	3 подкожные инъекции с интервалом 14 дней в 2 точки вдоль хребта
2		САНЧ, 0,5 мг/мл	
3		ПАФ, НАФ в смеси 1:1	
4	ИгГ кролика, 1 мг/кг	ПАФ, НАФ в смеси 1:1	
5	Физраствор без антигена	САНЧ, 0,5 мг/мл	
6	Физраствор без антигена	Без адъюванта	

Оценку двигательной активности и ориентировочно-исследовательского поведения вакцинированных крыс осуществляли на 42-й день от начала иммунизации с использованием установки «открытое поле» с программным обеспечением «Минотавр» (ООО «Нейроботикс», Россия). Время тестирования каждого животного составляло 10 мин, при этом в автоматическом режиме производилась видеозапись с регистрацией количества стоек, заглядываний в лунки, заходов в центр, фиксировалось время нахождения животного в неподвижности и пройденное расстояние.

По окончании эксперимента производилась декапитация животных под эфирным наркозом и забор крови. Наличие антител в полученных сыворотках крови определяли с помощью ИФА [14]. За величину титра принимали конечное разведение сыворотки, при котором оптическая плотность ОП 492 превышала значение

в контроле в 2 раза. Кривые титрования строили по средним значениям ОП 492, полученным при анализе сывороток крови крыс каждой группы ( $n = 10$ ). Очистку АТ2-М из сыворотки крови крыс с наибольшими титрами осуществляли с помощью аффинной хроматографии по методике [15] с использованием иммуносорбента – CNBr-сефароза4В + первичные антитела к производным морфина (АТ1-М крысы).

Оценку влияния АТ2-М на синтез ДНК в клетках глиобластомы человека Т98G *in vitro* проводили с использованием методики [16].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Excel-2010 и Biostatistics [17].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Найденные на основании полученных ингибиторных кривых константы аффинности антител варьировали от  $1 \times 10^{-6}$  до  $1 \times 10^{-7}$  М.

В ходе иммунизации крыс выделенными препаратами IgG кролика, содержащими АТ1-М, была осуществлена оценка эффективности адъювантных свойств препарата САНЧ в сравнении с адъювантом Фрейнда. Результаты проверки представлены на рис. 1.

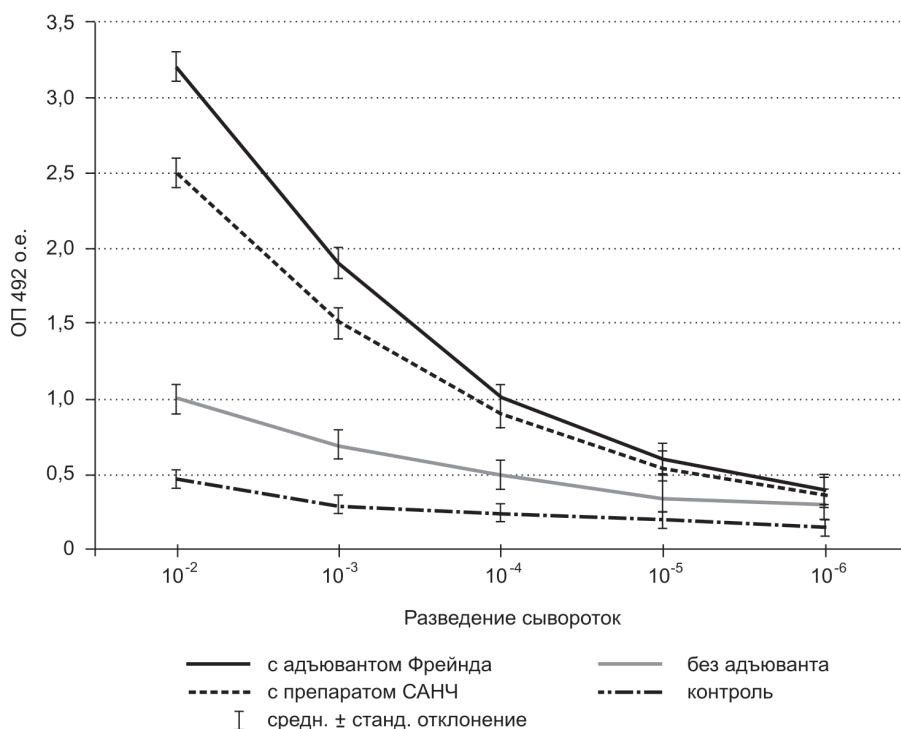


Рис. 1. Определение титров АТ2-М в сыворотках крови крыс «сэндвич»-методом ИФА.

Проведенные исследования по изучению адъювантных свойств препарата САНЧ выявили отсутствие побочных эффектов, которые наблюдались при использовании адъюванта Фрейнда (гранулемы на месте инъекции). При этом иммунный ответ усиливался аналогичным образом.

Анализ сывороток крови крыс после вакцинации показал, что антиидиотипические антитела к морфину курсируют в организме животных в относительно небольших титрах –  $1 \times 10^{-4}$  до  $2 \times 10^{-5}$ . Из сывороток крови с максимальными титрами были выделены препараты АТ2-М для оценки их биологических свойств в системе *in vitro*.

Тестирование *in vitro* вторичных поликлональных АТ2-М крыс, иммунизированных АТ1-М кролика, показало, что АТ2-М аналогично морфину усиливают синтез ДНК в культурах Т98G, диапазон концентраций для АТ2-М от 0,75 до 0,6 мкг/мл и при действии морфина от 0,375 до 0,6 мкг/мл (рис. 2).

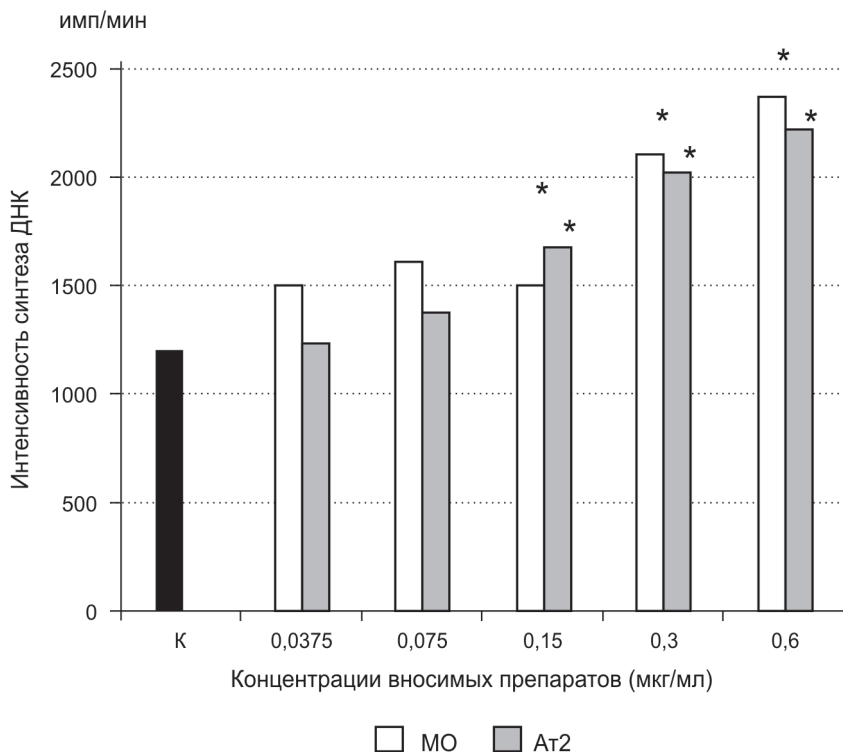


Рис. 2. Интенсивность синтеза ДНК в культуре клеточной линии Т98G после действия морфина (МО), АТ2-М в условиях *in vitro*; \* –  $p < 0,05$  – статистически значимое отличие показателей в сравнении с контролем (К) без внесения испытуемых веществ;  $t$ -критерий Стьюдента.

Ранее при исследовании морфин-специфических антигенных и функциональных свойств поликлональных и моноклональных антиидиотипических антител к морфину (АТ2-М) нами были выявлены их морфин- имитирующие функциональные свойства на клетках линии Т98G. Добавление в культуру клеток нормальных иммуноглобулинов лабораторных животных не вызывало увеличение синтеза ДНК [18]. Увеличение синтеза ДНК наблюдалось только под воздействием морфина и АТ2-М, что свидетельствует об их сходном воздействии на клетки.

Совместное внесение в культуру АТ2-М и антагониста опиоидных рецепторов налоксона приводило к устранению стимулирующего эффекта синтеза ДНК препаратом АТ2-М в культуре клеток аналогично совместному действию морфина и налоксона (рис. 3).

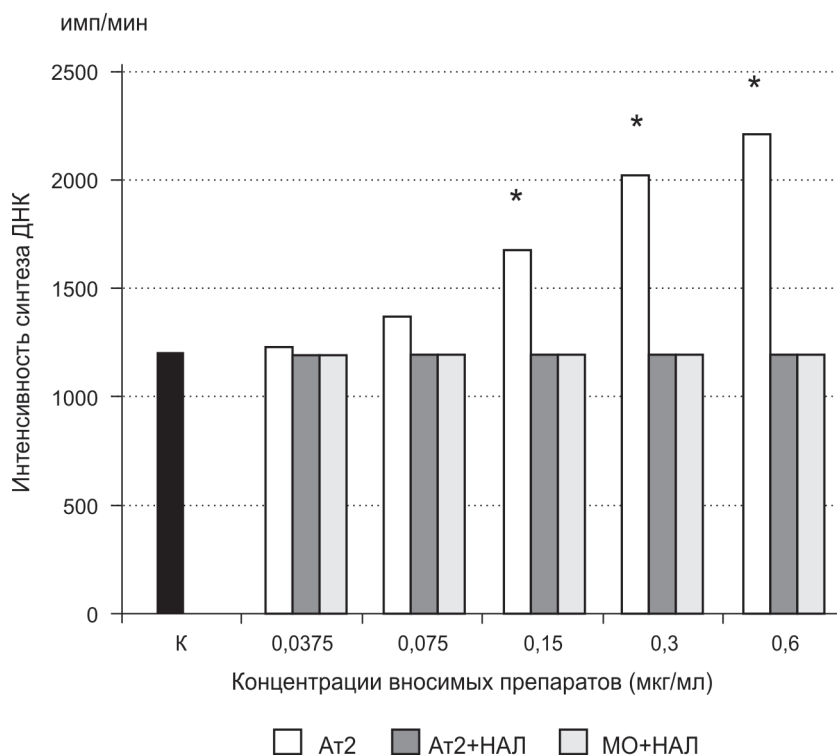


Рис. 3. Интенсивность синтеза ДНК в культуре клеточной линии Т98G при совместном введении АТ2 антител и налоксона (АТ2+НАЛ) или морфина и налоксона (МО+НАЛ) в условиях *in vitro*; \* –  $p < 0,05$  – статистически значимое отличие показателей в сравнении с контролем (К) без внесения испытуемых веществ; *t*-критерий Стьюдента.

Таким образом, установлено, что препарат АТ2-М, полученный от крыс, вакцинированных препаратом АТ1-М, усиливает синтез ДНК в культурах клеточной линии Т98G (экспрессирующей на мембране клеток опиоидные рецепторы), т.е. обладает агонистическими свойствами к опиоидным рецепторам, поскольку в системе *in vitro* проявляет действие аналогичное действию морфина.

В методических указаниях по изучению морфиноподобного действия фармакологических веществ [19] констатируется, что изучение двигательной активности животных в «открытом поле» может служить одним из критериев оценки действия тестируемого вещества.

Результаты по изучению влияния циркулирующих АТ2-М в крови крыс, иммунизированных препаратом кроличьих АТ1-М, на показатели ориентировочно-исследовательской и двигательной активности в установке «открытое поле» представлены в табл. 2, 3.

Таблица 2. Результаты оценки двигательной активности крыс в установке «открытое поле»

Показатель	Группы иммунизированных крыс (n = 10)					
	1	2	3	4	5	6
	АТ1-М без адьюванта	АТ1-М + ПАФ	АТ1-М + САНЧ	САНЧ	NIgG + ПАФ	Контроль – физраствор
Горизонтальная активность, с	391,57 *p = 0,03	333,80 *p = 0,03	410,21 *p = 0,03	264,40 *p = 0,03	326,70 *p = 0,03	276,20 *p = 0,03
Неподвижность, с	435,76 *p = 0,01	565,84 *p = 0,01	469,91 *p = 0,01	335,40 *p = 0,01	572,00 *p = 0,01	323,60 *p = 0,01
Пройденное расстояние, м	46,8 *p = 0,01	43,01 *p = 0,01	57,61 *p = 0,01	38,05 *p = 0,01	32,64 *p = 0,01	43,00 *p = 0,01

Примечание: \* – статистически значимое различие по критерию Крускала–Уоллиса.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы нами были получены первичные поликлональные кроличьи антитела (АТ1-М) к производным морфина – 3-О карбоксиметильному (КММ-БСА) и гемисукцинильному (ГСМ-БСА). Иммунизация крыс линии Wistar аффинно очищенным препаратом АТ1-М с использованием двух адьювантов – адьюванта Фрейнда и САНЧ приводила к образованию в организме животных АТ2-М в сходных титрах  $2 \times 10^{-5}$ .

Оценка биологических свойств АТ2-М с применением линии перевиваемых клеток глиобластомы Т98G позволила выявить, что антиидиотипические антитела к морфину оказывают на клетки действие, подобное действию морфина.



Таблица 3. Результаты оценки ориентировочно-исследовательского поведения крыс в установке «открытое поле»

Показатель	Группы иммунизированных крыс (n = 10)					
	1	2	3	4	5	6
	AT1-M без адьюванта	AT1-M + ПАФ	AT1-M + САНЧ	САНЧ	NIgG + ПАФ	Контроль – физраствор
Стойки	27,4	8,75	55,6	35,25	24,25	32,5
Заглядывание в лунки	9	4,5	18,75	15,62	2,62	8,75
Грумминг	8,87	1	6,25	8,6	9,87	6,5
Заход в центр	1,25	0,25	2,37	1,8	0,5	1,75

Примечание. \* – статистически значимое различие по критерию Крускала–Уоллиса.

Ранее в исследованиях М. Lazarczyk с соавт. [9] и J. Kraus [10] были получены аналогичные результаты. Авторы показали с применением иммуноцитохимических методов, что морфин оказывает стимулирующий эффект на синтез ДНК в клетках глиомы культуры T98G.

В тесте «открытое поле» было показано, что поведение крыс, иммунизированных AT1-M с применением адьюванта САНЧ, отличалось более высокой ориентировочно-исследовательской деятельностью – количество стоек и заглядываний в лунки превышало аналогичные показатели у интактных крыс в 2 раза, при этом показатели двигательной активности в опыте и контроле существенно не различались. Интересно, что при использовании для иммунизации только САНЧ также наблюдалось незначительное увеличение ориентировочно-исследовательской и двигательной активности. Это свидетельствует о том, что в увеличение ориентировочно-исследовательской деятельности вносят свой вклад как антиморфиновые антитела, так и сферические аморфные наночастицы из тритерпеноидов бересты (САНЧ).

В группах крыс, иммунизированных с применением адьюванта Фрейнда, напротив, наблюдалось угнетение ориентировочно-исследовательской деятельности и двигательной активности, уменьшался грумминг в 6 раз по сравнению с контролем, что свидетельствует о некомфортном состоянии животных. Возможно, причиной этого было наличие побочных эффектов – воспалений на месте инъекций (гранулем).

Известно, что активация ориентировочно-исследовательской деятельности – стремление исследовать новые пространства у крыс и мышей расценивается как признак расторможенности (дезингибиции), и это может быть связано с изменением катехоламинов мозга [20]. Также повышение ориентировочно-

исследовательской активности у крыс может свидетельствовать об улучшении их психоэмоционального состояния. Возможно, это связано с тем, что циркулирующие в крови иммунизированных животных АТ2-М обладают анксиолитическим/транквилизирующим действием, подобным действию опиоидных пептидов на нервную систему [21].

По мнению ряда исследователей, одним из компонентов лечения опийной наркомании является применение антидепрессантов. Препараты данного класса способны влиять не только на аффективную симптоматику у больных, но и на их влечение к наркотикам [22].

Возвращаясь к описанному ранее феномену снижения влечения к наркотику у крыс, вакцинированных моноклональными антиморфиновыми антителами [4], можно предположить, что проведенные нами исследования эффектов вакцинации крыс поликлональными антиморфиновыми антителами помогут в создании иммунобиологического препарата от опиатной зависимости.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность профессору А.П. Каплуну за любезно предоставленный препарат САНЧ для проведения исследований.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Киржанова В.В. Наркоситуация в Российской Федерации в свете реализации государственной антинаркотической политики // Вопросы наркологии. 2021. № 10 (205). С. 5–37. doi: 10.47877/0234-0623\_2021\_10\_5
2. Bremer P.T., Janda K.D. Conjugate vaccine immunotherapy for substance use disorder // Pharmacological Reviews. 2017. Vol. 69, No 3. P. 298–315. doi: 10.1124/pr.117.013904
3. Патент 2548802 РФ. Иммуноген для лечения и профилактики зависимости от опиатов / Н.Б. Гамалея, А.Г. Берзина, К.А. Шестаков, Г.Д. Капанадзе, А.О. Ревякин, Ю.В. Фокин. А61К 39/395. 2015.
4. Судаков С.К., Русакова И.В. Влияние иммунизации крыс антиморфиновыми антителами на чувствительность к морфину и предрасположенность к формированию зависимости // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2005. Т. 140, № 11. С. 535–538.
5. Патент 2264228 РФ. Средство для профилактики и лечения опийной наркомании / С.К. Судаков. А61К 39/395. 2005.
6. Holme J.A., Dybing E. The use of in vitro methods for hazard characterization of chemicals // Toxicol. Lett. 2002. Vol. 127. P. 135–141.
7. Pfaller W., Balls M., Clothier R. et al. Novel advanced in vitro methods for long-term toxicity testing: the report and recommendations of ECVAM workshop 45. European Centre for the Validation of Alternative Methods // Alt. Lab. Anim. 2001. Vol. 29, No 4. P. 393–426.
8. Гамалея Н.Б., Ульянова Л.И., Берзина А.Г., Ульянова М.А., Кротов Г.И., Родченков Г.М. Оценка биологической активности первичных (идиотипических) и вторичных (антиидиотипических) антител к морфину в культуре лимфоцитов человека in vitro // Вопросы наркологии. 2016. № 1. С. 3–11.
9. Lazarczyk M., Matyja E., Lipkowski A.W. A comparative study of morphine stimulation and biphallin inhibition of human glioblastoma T98G cell proliferation in vitro // Peptides. 2010. Vol. 31, No 8. P. 1606–1612. doi: 10.1016/j.peptides.2010.05.002

10. Kraus J. Expression and functions of  $\mu$ -opioid receptors and cannabinoid receptors type 1 in T lymphocytes // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2012. Vol. 1261. P. 1–6. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06524.x
11. Бастрич А.Н., Красильникова В.В., Лыу Т.Н. и др. Солюбилизация тритерпеноидов лупанового ряда, выделенных из бересты // Биотехнология. 2008. № 6. С. 51–59.
12. Каплун А.П., Безруков Д.А., Попенко В.И., Швеи В.И. Сферические аморфные наночастицы из тритерпеноидов бересты – новый тип субмикронных средств доставки лекарственных субстанций // Биофармацевтический журнал. 2011. Т. 3, № 2. С. 28–40.
13. Берзина А.Г., Станкова Н.В., Каплун А.П., Буркова А.А., Гамалея Н.Б. Изучение адъювантных свойств наночастиц из экстракта бересты при иммунизации минисвиней светлогорской популяции // Биомедицина. 2021. Т. 17, № S3. С. 133–138. doi: 10.33647/2713-0428-17-3E-133-138
14. Патент 2717989С1 РФ. Моноклональное антиидиотипическое антитело АИ-G1, обладающее антигенными свойствами морфина / А.В. Трофимов, Н.П. Горбунов, А.М. Ищенко, А.Я. Рак, Е.А. Протасов, Е.А. Карабанова, Н.Б. Гамалея, Л.И. Ульянова, А.Г. Берзина, Т.А. Климова. С07К 16/42. 2020.
15. Патент 2094078 РФ. Хроматографический способ выделения альфа-фетопротеина / Д.В. Кулаев, С.М. Насибов, С.С. Маркин, Ю.Г. Бобков, М.П. Семенов. А61К 38/00. 1997.
16. Гамалея Н.Б., Ульянова М.А., Берзина А.Г., Ульянова Л.И. Тестирование психоактивных веществ и антител к ним в модели *in vitro* // Наркология. 2014. Т. 13. № 11 (155). С. 37–41.
17. Гланц С. Медико-биологическая статистика / пер. с англ. М.: Практика, 1999. 459 с.
18. Трофимов А.В., Горбунов Н.П., Ищенко А.М. и др. Морфин-специфические антигенные и функциональные свойства поли- и моноклональных антиидиотипических антител // Иммунология. 2019. Т. 40, № 4. С. 5–12. doi: 10.24411/0206-4952-2019-14001
19. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. В.П. Фисенко и др. М., 2000. 832 с.
20. Леушкина Н.Ф., Федорова А.М., Калимуллина Л.Б., Ахмадеев А.В. Анализ поведения и содержания катехоламинов мозга до и после стресса у крыс с генотипом A1/A1 по локусу Taq1a D2 рецептора // Фундаментальные исследования. 2013. № 8-4. С. 896–899.
21. Чеснокова Е.А., Сарычева Н.Ю., Дубынин В.А., Каменский А.А. Опиоидные пептиды, получаемые с пищей, и их влияние на нервную систему // Успехи физиологических наук. 2015. Т. 46, № 1. С. 22–46.
22. Роскошная Д.В., Скальский С.В., Ступакова Л.В., Титов Д.С. Сравнительная эффективность и безопасность применения антидепрессантов в постабстинентном периоде опийной наркомании // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 2. С. 119–120.

## REFERENCES

1. Kirzhanova VV. [Drug situation in the Russian Federation in the light of the implementation of the state anti-drug policy]. Voprosy narkologii [Journal of Addiction Problems]. 2021;(10): 5–37. doi: 10.47877/0234-0623\_2021\_10\_5
2. Bremer PT, Janda KD. Conjugate vaccine immunotherapy for substance use disorder. Pharmacological Reviews. 2017;69(3):298–315. doi: 10.1124/pr.117.013904
3. Gamaleya NB, Berzina AG, Shestakov KA, Kapanadze GD, Revyakin AO, Fokin YuV. [Immunogen for the treatment and prevention of opiate addiction]. Patent RF 2548802. А61К 39/395. 2015. (In Russ.)
4. Sudakov SK, Rusakova IV. [The effect of immunization of rats with antimorphine antibodies on sensitivity to morphine and predisposition to the formation of dependence]. Byulleten'

- eksperimental'noi biologii i meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]. 2005;140(11):535–8. (In Russ.)
5. Sudakov SK. [A means for the prevention and treatment of opium addiction]. Patent RF 2264228. A61K 39/395. 2005. (In Russ.)
  6. Holme JA, Dybing E. The use of in vitro methods for hazard characterization of chemicals. *Toxicol. Lett.* 2002;127:135–41.
  7. Pfaller W, Balls M, Clothier R, et al. Novel advanced in vitro methods for long-term toxicity testing: the report and recommendations of ECVAM workshop 45. European Centre for the Validation of Alternative Methods // *Alt. Lab. Anim.* 2001;29(4):393–426.
  8. Gamaleya NB, Ulyanova LI, Berzina AG, Ulyanova MA, Krotov GI, Rodchenkov GM. [In vitro assessment of biological activity of primary (idiotypic) and secondary (anti-idiotypic) antibodies to morphine in cultured human lymphocytes]. *Voprosy narkologii [Journal of Addiction Problems]*. 2016;(1):3–11. (In Russ.)
  9. Lazarczyk M, Matyja E, Lipkowski AW. A comparative study of morphine stimulation and biphalin inhibition of human glioblastoma T98G cell proliferation in vitro // *Peptides*. 2010;31(8):1606–12. doi: 10.1016/j.peptides.2010.05.002
  10. Kraus J. Expression and functions of  $\mu$ -opioid receptors and cannabinoid receptors type 1 in T lymphocytes. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2012;1261:1–6. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06524.x
  11. Bastrich AN, Krasilnikova VV, Lyu TN, et al. [Solubilization of lupanic triterpenoids isolated from birch bark]. *Biotehnologiya [Biotechnology in Russia]*. 2008;(6):51–9. (In Russ.)
  12. Kaplun AP, Bezrukov DA, Popenko VI, Shvets VI. [Spherical amorphous nanoparticles from birch bark triterpenoids – a new type of submicron delivery means of medicinal substances]. *Biofarmatsevticheskii zhurnal [Russian Journal of Biopharmaceuticals]*. 2011;3(2):28–40. (In Russ.)
  13. Berzina AG, Stankova NV, Kaplun AP, et al. [Investigation of the adjuvant properties of nanoparticles from a birch bark extract used for immunization of mini pigs of the Svetlogorsk population]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;17(S3):133–8. (In Russ.) doi: 10.33647/2713-0428-17-3E-133-138
  14. Trofimov AV, Gorbunov NP, Ishchenko AM, Cancer AY, Protasov EA, Karabanova EA, Gamaleya NB, Ulyanova LI, Berzina AG, Klimova TA. [Monoclonal anti-idiotypic antibody AI-G1, having antigenic properties of morphine]. Patent RF 2717989C1. C07K 16/42. 2020. (In Russ.)
  15. Kulaev DV, Nasibov SM, Markin SS, Bobkov YuG, Semenov MP. [Chromatographic method for isolation of alfa-fetoprotein]. Patent RF 2094078. A61K 38/00. 1997. (In Russ.)
  16. Gamaleya N.B., Ulyanova M.A., Berzina A.G., Ulyanova L.I. [Testing of psychoactive drugs and drug-specific antibodies in the in vitro model]. *Narkologiya [Narcology]*. 2014;13(11):37–41. (In Russ.)
  17. Glants S. *Mediko-biologicheskaya statistika*. Moscow: Praktika; 1999. 459 p. (In Russ.)
  18. Trofimov AV, Gorbunov NP, Ishchenko AM, et al. [Morphine-specific antigenic and functional properties of poly- and monoclonal anti-idiotypic antibodies]. *Immunologiya*. 2019;40(4):5–12. doi: 10.24411/0206-4952-2019-14001
  19. Fisenko VP, et al, eds. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv*. Moscow; 2000. 832 p. (In Russ.)
  20. Leushkina NF, Fedorova AM, Kalimullina LB, Akhmadeev AV. Analysis of the behavior and content of catecholamines in the brain before and after stress in rats with genotype A1/A1 on the locus TAQ1A D2 receptor. *Fundamental'nye issledovaniya [Fundamental research]*. 2013;(8-4):896–9. (In Russ.)

21. Chesnokova EA, Sarycheva NYu, Dubynin VA, Kamensky AA. Opioidnye peptidy, poluchaemye s pishchei, i ikh vliyanie na nervnyuyu sistemu. Uspekhi fiziologicheskikh nauk [Progress in Physiological Science]. 2015;46(1):22–46. (In Russ.)
22. Roskoshnaya DV, Skalsky SV, Stupakova LV, Titov DS. Sravnitel'naya effektivnost' i bezopasnost' primeneniya antidepressantov v postabstinentnom periode opiinoy narkomanii. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya [Modern problems of science and education]. 2013;(2):119–20. (In Russ.)

## INFLUENCE OF ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES TO MORPHINE ON THE BEHAVIOR OF VACCINATED RATS IN AN EXPERIMENT WITH THE USE OF A PREPARATION OF NANOPARTICLES FROM BIRCH BARK TRITERPENOIDS AS AN ADJUVANT

Berzina AG<sup>1</sup>, Ulyanova LI<sup>1</sup>, Savina MA<sup>1</sup>, Burkova AA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> V. Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology  
Moscow, Russia

<sup>2</sup> MIREA – Russian Technological University  
Institute of Fine Chemical Technologies named after M.V. Lomonosov  
Moscow, Russia

This paper presents materials on the study of the behavior of rats in the "Open Field" test after a cycle of immunization with a preparation of primary rabbit antibodies (AT1-M) to two morphine derivatives (6-hemisuccinyl and 3-O-carboxymethyl esters). To enhance the immune response, SANP adjuvant (spherical amorphous nanoparticles from birch bark triterpenoids) was used in comparison with Freund's adjuvant (FA). Research conducted to study the adjuvant properties of birch bark extract nanoparticles has shown that the SANP drug leads to an increased immune response similar to the complete Freund adjuvant (CFA) and incomplete Freund's adjuvant (IFA) used in animals.

Anti-idiotypic antibodies to morphine (secondary AT2-M) formed in rats as a result of vaccination showed morphine-like properties on a cell culture of glioblastoma T98G expressing opioid receptors on its surface. Rats vaccinated with AT1-M + SANP had a higher tentative research activity in the "Open Field" test, and a slight increase in motor activity compared to the control – intact rats.

**Keywords:** anti-idiotypic antibodies, morphine derivatives, "open field", motor activity, nanoparticles, birch bark triterpenoids, betulin, adjuvants, immune response, rats.

**For citation:** Berzina AG, Ulyanova LI, Savina MA, Burkova AA. [Influence of anti-idiotypic antibodies to morphine on the behavior of vaccinated rats in an experiment with the use of a preparation of nanoparticles from birch bark triterpenoids as an adjuvant]. Voprosy narkologii [Journal of Addiction Problems]. 2023;35(3):85–97. (In Russ.)